

文章编号:1000-582X(2004)01-0120-03

树舌、茯苓多糖的提取分离及组成*

连宾^{1,2}, 郁建平³

(1. 贵州工业大学 化学与生物工程学院, 贵阳 550003; 2. 重庆大学 西南资源开发及环境灾害控制工程教育部重点实验室, 重庆 400030; 3. 贵州大学生化营养研究所, 贵州贵阳 550025)

摘要:对树舌(*Ganoderma apparatus*)、茯苓(*poria cocos*)多糖的提取、纯化和单糖的组成成分进行了研究。认为树舌子实体和茯苓菌核经热水提取、脱色和乙醇沉淀分别得到相应多糖(树舌多糖 Ga, 茯苓多糖 Pc)粗品, 多糖粗品经脱蛋白, 乙醇分级沉淀、Sephadex G-15 葡聚糖凝胶柱层析纯化得 Ga-1、Ga-2、Ga-3 和 Pc-1、Pc-2、Pc-3 3 个级分, 并应用薄板层析技术, 确定树舌多糖 3 个级分均由葡萄糖、树胶醛糖、甘露糖、果糖及一种未知单糖组成, 茯苓多糖 3 个级分均由葡萄糖、甘露糖、核糖及一种未知单糖组成。

关键词:树舌; 茯苓; 多糖; 提取; 组成

中图分类号:Q539

文献标识码:A

树舌和茯苓均为真菌门(Eumycota)、层菌纲(Hyphomycetes), 非褶菌目(Aphyllporales)真菌, 其中前者隶属灵芝科(Ganodermataceae)、灵芝属(*Ganoderma*); 后者隶属多孔菌科(Polyporaceae), 卧孔菌属(*Polyporus*)。野生茯苓分布很广, 我国主要分布在云南、福建、安徽、山东、湖南、江西、江苏、浙江、广东、广西、贵州、四川等省区, 目前已经可以人工栽培^[1-3]。相比之下, 树舌分布更广, 世界范围内都有, 中国各省区均有报道^[4]。

树舌和茯苓都是我国传统的天然药物, 药用价值很高。树舌具有抗癌、清热、消毒、化痰、化积、止血、止痛的功效, 多用于乙型肝炎、食道癌、神经衰弱和肺结核等的治疗^[5-8], 日本民间把树舌粉加工成枣泥、用蜂蜜制成蜜丸治疗肝癌, 已获得明显疗效^[3-4]。茯苓药性缓和, 能补心脾, 渗浊利水, 安神固精, 补而不峻, 利而不猛, 既能扶正, 又可祛邪, 在古中医名方中, 80%左右的方剂都有它的配伍^[2,3,9-10]。茯苓除供药用外, 还是滋补营养品, 其加工做成的多种食品, 如“茯苓酥”、“茯苓糖”、“茯苓夹饼”以及茯苓蒸鸡、茯苓海参汤等既是美味佳肴, 又是治病良药十分受人欢迎^[2-3]。

多糖是树舌和茯苓的重要组成成分, 文章以贵州黔东南人工栽培的茯苓及野生树舌为材料, 探讨这两种真菌多糖的提取分离及组成。作者采用热水萃取、

有机溶剂沉淀和凝胶层析等方法, 从中分离得到多糖, 并利用薄板层析方法, 确定了该 2 种不同多糖的单糖组成, 为进一步研究树舌和茯苓多糖的化学结构和生物活性提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料选用贵州省锦屏县野生树舌子实体和黔东南人工栽培的茯苓菌核为多糖提取材料。所用各种试剂除乙醇为 95% 食用酒精、各种单糖标准品为生化试剂(上海东风生化试剂厂产品)外, 其余均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 提取粗多糖

将树舌子实体和茯苓菌核切碎(茯苓菌核先去皮)烘干后称量, 采用热水浸提法, 每次原料和水之比均为 1:5, 浸提温度为 70~80℃, 浸提时间 3~5 h, 共提取 4 次, 合并 4 次浸提液。真空减压浓缩, 浓缩一倍体积。对树舌多糖提取液需进行脱色处理, 即以 1% 的比例加入活性炭, 搅拌均匀 15 min 后过滤即可。在浓缩液中加入 3 倍体积的乙醇(95%)搅拌, 沉淀为多糖和蛋白质的混合物, 此为粗多糖^[11]。

* 收稿日期:2003-10-11

基金项目:教育部西部地区高等学校高级访问学者计划项目

作者简介:连宾(1964-), 男, 安徽凤阳县人, 贵州工业大学教授, 博士, 主要从事土壤和食品微生物方面的研究。

1.2.2 粗多糖提纯

粗多糖溶液加入 Sevag 试剂(氯仿:异戊醇=3:1混合摇匀)后,置恒温振荡器中震荡过夜,使蛋白质充分沉淀,离心(3 000 r/min)分离,去除蛋白质。脱游离蛋白后,上葡聚糖凝胶柱分离纯化。选用 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶,将已充分膨胀的葡聚糖凝胶湿法装柱,用氯化钠水溶液进行平衡。样品上柱后,用蒸馏水洗脱,分部收集。洗脱液经不同浓度乙醇沉淀,离心,干燥沉淀即得较为纯化的树舌多糖 Ga-1、Ga-2、Ga-3 3 个级分和茯苓多糖 Pc-1、Pc-2、Pc-3 3 个级分。

1.2.3 单糖组分分析

按文献[11]方法进行:称取少许的多糖(0.1 克)于 2.0 mL 离心管中,加入 1 M 的硫酸 1 mL,沸水浴水解 2 h,然后加氢氧化钡中和至中性,过滤除去硫酸钡沉淀,得多糖水水解澄清液,以此进行点样;薄层层析法一般只展开 1 次,为达到较好分离效果,实验选用二次展开法,即:在第 1 种展开剂中展开后,晾干,再放入第 2 种展开剂中进行层析展开。

多糖的提取、分离纯化和单糖组分分析流程如下:

原料 → 预处理(清洗) → 干燥、切片、称量
 $0 \sim 80^\circ\text{C}$ 热水浸提 $3 \sim 5 \text{ h}$ → 提取液过滤 → 重复提取 3 次,合并
 滤液减压浓缩至 1/2 体积 → 树舌多糖提取液脱色
 → 乙醇沉淀多糖(上清液回收酒精) → 沉淀(粗蛋白多糖) → 加适量的蒸馏水搅拌 → 加 sevag 试剂除蛋白 → 离心上清液(弃沉淀) → 过柱,分步收集 → 乙醇分级沉淀 → 精制多糖(Ga-1、Ga-2、Ga-3 和 Pc-1、Pc-2、Pc-3) → 单糖组分分析

2 结果与讨论

2.1 树舌、茯苓多糖提取

食用菌多糖提取目前多采用热水浸提和酒精沉淀法进行。影响多糖提取率的因素很多,如:浸提温度、时间、加水量以及脱除杂质的方法等都会影响食用菌多糖的得率。在不明显影响多糖浸出率的情况下,浸出液体积越少越好,在本研究中选用于实体和水之比为 1:5;试验发现,当浸提液体积一定时,分多次浸提比一次浸提的多糖浸提率高,这与许多文献的报道是一致的;提取过程中长时间的高温浓缩难免会影响所提多糖的活性和增加多糖中的杂质,故浸提温度选择在 $70 \sim 80^\circ\text{C}$,提取液低于 70°C 下旋转蒸发浓缩^[11-13];当浸提时间多于 5 h 后,大部分多糖包括果胶、粘液质等已溶出达平衡,故无需过长的提取时间,本研究中浸提时间选择在 3~5 h。必须指出的是,笔者所选用多糖提取条件的依据是文献和经验,这并不一定是树舌和茯苓多糖提取的最佳条件。用水提醇沉

法对树舌、茯苓粗多糖提取,结果见表 1:

名称	原料来源	总糖含量	粗多糖含量
茯苓	贵州省锦屏县	0.84	2.663
树舌	贵州省锦屏县	0.52	3.180

说明:多糖含量=粗多糖重/原料重;总糖含量测定按直接滴定法(GB/T5009.19-85)测定。

2.2 树舌、茯苓多糖的纯化

多糖的纯化,就是将存在于粗多糖中的杂质去除而获得单一的多糖组分。一般是先脱除非多糖组分,再对多糖组分进行分级。本项实验采用 Sevag 法(氯仿:异戊醇=3:1混合摇匀)进行脱蛋白,用 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶柱进行进一步的纯化,然后分别加入 95% 的乙醇,使过柱液中乙醇终浓度分别达 55%、70%、85%,多糖沉淀,离心、沉淀烘干即为分级后的多糖,树舌和茯苓多糖组分分级情况见表 2。

乙醇浓度	样品	过柱液多糖含量	洗柱液多糖含量	各级总含量	总含量
55 %	树舌	0.098 26	0.006 76	0.105 02	树舌多糖: 0.221 42
	茯苓	0.076 02	0.027 24	0.103 26	
70 %	树舌	0.055 42	-	0.055 42	茯苓多糖: 0.239 71
	茯苓	0.022 62	-	0.022 62	
85 %	树舌	0.054 97	0.006 01	0.060 98	0.239 71
	茯苓	0.087 17	0.026 66	0.113 83	

说明:1)过柱液多糖含量 % = 过柱液多糖质量/样品质量 × 100 %; 2)洗柱液多糖含量 % = 洗柱液多糖质量/样品质量 × 100 %; 3)多糖总含量 % = 过柱多糖含 % + 洗柱液多糖含量 %; 4)一线表示该条件下没有得到沉淀。

2.3 树舌、茯苓多糖单糖组成成分分析结果

采用薄层层析法分析单糖组分。薄层层析显色后,根据不同单糖标样参考斑点的颜色和相对位置及 R_f 值或 R_g 值,同多糖水解所得单糖斑点的颜色和相对位置及 R_f 值或 R_g 值,确定 Pc-1、Pc-2、Pc-3,三个级分的茯苓多糖单糖组分相同,均为葡萄糖、甘露糖、核糖及一种未知单糖。

同上,树舌多糖中含有 5 种单糖,分别为:葡萄糖、树胶醛糖、甘露糖、果糖及一种未知单糖。此结果与文献[4,13]报道接近。

3 结 语

多糖是一种能够增强人体免疫功能的生物活性物质,国际学术界称之为生物应答效应物(Biological Response Modifier),目前已经成为分子生物学、食品科学、药学等领域中的热点研究内容之一^[14-16]。随着分子生物学的发展,人们逐级认识到糖及其复合分子具

有极其重要的生物学功能,多糖与免疫功能的调节、细胞与细胞的识别、细胞间物质的运输、癌症的诊断与治疗等都有着密切的关系^[16-19]。开展多糖资源的开发、多糖结构的分析、多糖药理作用等的研究具有十分重要的意义^[15, 17, 20-21]。近年来,有关食用菌多糖的研究、报道的频率相当高,人们一直在努力寻找提取多糖的最佳方法以及不断获得新的功能性多糖资源。树舌、茯苓作为我国重要的药用真菌资源,其多糖的研究工作将有助于对树舌和茯苓的进一步开发利用。

致谢:研究工作得到重庆大学西南资源开发及环境灾害控制工程教育部重点实验室许江教授大力支持。

参考文献:

- [1] 严泽湘,严奉伟,刘云. 名贵珍稀菇菌栽培新法——银耳、茯苓、鸡枞菌[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2002. 80-106.
- [2] 陈德明. 食用菌生产技术手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001. 261-266.
- [3] 陈士瑜,陈惠. 菇菌栽培手册[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2003. 244-268, 311-317.
- [4] 陈刚,李毅,董林. 树舌研究应用概况[J]. 华西药理学杂志, 1993, 8(1): 47-50.
- [5] 潘洪明,于英君. 树舌多糖、猪苓多糖对小鼠 HepA 瘤细胞 TNF- α 表达的影响[J]. 中国基层医药, 2002, 9(6): 486-487.
- [6] 于英君,刘丽波. 树舌多糖 GF 免疫调节作用研究[J]. 中医药信息, 1999, 16(2): 64-64.
- [7] 唐丽霞,王百龄. 复方树舌片治疗慢活肝 142 例疗效观察[J]. 河北中西医结合杂志, 1996, 5(4): 86-86.
- [8] 王百龄,卢少琪. 复方树舌片治疗慢性活动性肝炎 142 例[J]. 新药与临床, 1990, 9(5): 307-308.
- [9] 高学军,孙亚荣,李艳波. 茯苓多糖体的抗肿瘤作用及药理研究[J]. 中医药学报, 1996, 24(1): 45-47.
- [10] 陈春霞. 茯苓多糖体的药理药化研究及其临床应用初探[J]. 中草药, 1985, 16(4): 40-44.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1999. 73-75.
- [12] 詹道松. 不同的提取方法对喜热灵芝和树舌多糖提取率的影响[J]. 海南大学学报(自然科学版), 1993, 11(4): 41-44.
- [13] 谭日红,张翼伸. 长白山树舌水溶性多糖的研究[J]. 东北师大学报, 1991, 23(4): 81-86.
- [14] 董群,方积年. 多糖在医药领域中的应用[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(10): 649-652.
- [15] 杜巍,李元瑞,袁静. 食用菌多糖生物活性与结构的关系[J]. 食用菌, 2001, 23(2): 3-5.
- [16] JAMES BEMILLER N. Structure-property relationships of water-soluble polysaccharides[J]. 应用糖质科学(日), 1996, 46(3): 377-384.
- [17] LINDBERG, BENGT, SVENSSON, et al. Microbial polysaccharides[M]. London: Butterworths, 1973. 319-344.
- [18] QUANBIN ZHANG, PENGZHAN YU. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from Porphyra haitanensis[J]. Journal of Applied Phycology, 2003, 15(4): 305-310.
- [19] JANE C ONWELUZO M R. Vijayalakshmi Detarium Microcarpum Polysaccharide as a Stabilizer in Processed Fruit Products[J]. Food Science and Technology, 1999, 32(8): 521-526.
- [20] 谭周进,谢达平. 多糖的研究进展[J]. 食品科技, 2002, 27(3): 10-12.
- [21] 赵国华,陈宗道,李志孝,等. 活性多糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(7): 45-48.

The Extraction, Isolation and the Composition of Polysaccharides From Ganoderma Apparatus and Poria Cocos

LIAN Bin^{1,2}, YU Jian-ping³

(1. Chemistry and Bio-engineering College, Guizhou University of Technology, Guiyang 550003, China;

2. Key Laboratory for the Exploitation of Southwestern Resources & the Environmental Disaster Control Engineering Under the State Ministry of Education, Chongqing 400030, China;

3. Institute of Biochemistry and Nutrition, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: This paper reports that the crude polysaccharides were extracted with hot water and precipitated with alcohol from the fruitbody of mushroom *Ganoderma apparatus* and *Poria cocos*. The free proteins were removed from crude polysaccharides by sevag method, and then the polysaccharides were isolated and purified by Sephadex G-15 gel column chromatography. Each three pure polysaccharides (Ga-1, Ga-2, Ga-3 and Pc-1, Pc-2, Pc-3) were obtained by precipitating with different concentration alcohol. By using the method of TLC, we proved that three fractions of *Ganoderma apparatus* polysaccharides are composed of glucose (Glu), arabinose (Ara), mannose (Man), fructose (Fru), et al. and the three fractions of *Poria cocos* polysaccharides are composed of glucose (Glu), mannose (Man) and ribose (Rib), et al.

Key words: ganoderma apparatus; poria cocos; polysaccharides; extraction; composition

(编辑 姚飞)